

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790021

研究課題名(和文) 集積的配糖化と水酸基保護法を利用した人工合成ワクチンアジュバントの創製

研究課題名(英文) Study on synthetic saponins, candidates of vaccine adjuvant, via construction of glycosidic bond at C28 ester moiety by using microflow reactor.

研究代表者

白畑 辰弥 (Shirahata, Tatsuya)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：30414056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ワクチンの添加剤として免疫能を高めるワクチンアジュバントが必要不可欠となっている。生薬オンジから得られる桂皮酸含有サポニンには、強いアジュバント活性を示すが、精製、全合成が困難である。そこで本研究では植物成分由来のアジュバントの創製を目指した。モデル実験の結果、糖部分の保護基の位置選択的な制御と、グリコシル化においてマイクロフローリアクターの使用により、桂皮酸含有サポニンの合成を達成した。また植物成分由来のトリテルペンの単離においては、合成樹脂の使用による実験工程の短縮に成功し、トリテルペンの新しい供給方法を確立できた。以上の様にして人工合成サポニン創製への方法論の確立ができた。

研究成果の概要(英文)：Against various infection diseases such as Influenza, clinical advance in effective and safety usage of vaccine depends on potent adjuvant. Onjisaponins included in *Polygala tenuifolia* Willd., were identified. Further drug development of these saponins is hampered by poor isolation yields. Even though synthetic attempt, the problem has been remained for the construction of C28 glycosidic bond inoleanolic acid and the introduction of cinnamoyl group. Herein we examined C28 glycosylation as a key step for the synthesis of simple saponin, for purpose of showing their adjuvant activity. In order to construct simple glucose moiety, chemoselective and regioselective construction of various esters was accomplished. A sensitive C28 glycosyl ester linkage was constructed by using micro flow reactor. In addition, a process for the preparation of tenuifolin, a natural triterpene, was achieved.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：配糖化 ワクチンアジュバント マイクロフローリアクター

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ等の感染症や、最近ではガンに対して有効な治療法の一つとしてワクチンが挙げられる。しかし免疫力の弱い乳幼児や高齢者には本来のワクチンの効力が発揮されない問題点も同時に抱えている。そこでワクチンを有効に接種するために、自免疫能を高める添加剤すなわちアジュバントが切望されている。

例えば、社会的問題となった新型インフルエンザは、その特徴の一つとして免疫力の低い乳幼児で重症化することが挙げられる。その有効な対策がワクチンである事はあるが、乳児(一才以下)では免疫力が不十分なため、その接種は認められていない。この様に本当に接種すべき患者に接種できない問題点を抱えており、ワクチンアジュバントは必須であるとされている。

前述の背景のもと植物由来の配糖体(サポニン)にアジュバントの作用があることが報告され、注目を浴びている(総説; *Advances in saponin-based adjuvants*, Hong-Xiang Sun ら, *Vaccine*, 2009年, 27巻, 1787-1796)。一方で我々北里の共同研究グループでは生薬オンジに含まれる配糖体(オンジサポニン)に、アジュバントとしてアレルギー反応を惹起する事なく免疫作用を向上させる事を報告した(Nagai, T.; Yamada, H ら, *Vaccine*, 2001年, 19巻, 4824-4834)。しかしこれらの含有植物は同時に分離困難なサポニンを多種生成する。これをそのままアジュバントとして実用化するのは精製が煩雑になり困難である。また全合成を試みても複雑な糖鎖と脂肪鎖を含むため多段階を要し、実用化に至っていない。

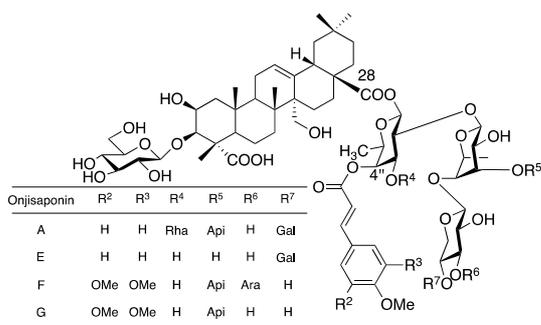


Figure 1. Structure of Onjisaponins

2. 研究の目的

生薬オンジから得られる桂皮酸含有サポニンは、強いアジュバント活性を示すが、精製、全合成が困難である。そこでそのサポニンの活性発現に重要な部分を残して構造を単純化し、誘導体合成を含めた学際的な研究を行う。そして最終的に新たに実用可能なワクチンアジュバントの創製を目的とした。

3. 研究の方法

生薬由来のリード化合物を基にして、活性発現に必要な構造だけを組み込んだ人工デザイン型のワクチンアジュバントを合成する。その際に必要な糖部分の合成と配糖化を反応を集積化する技術を用いて、その方法論を確立する。方

法論に基づいて人工合成アジュバントを合成し、その活性評価を行うこととした。

4. 研究成果

Onjisaponin 類の合成を行う際の課題として、プレセネゲニン骨格の 28 位に結合した糖部分の合成が挙げられる。Onjisaponin 類は糖 1 位のエステル結合や糖 4 位の桂皮酸エステルといった分子内のエステル結合を多く有するので、それらを位置及び化学選択的に制御することが必要となる。そのため、これまでに Onjisaponin の様な糖 4 位に桂皮酸エステルが結合するサポニン化合物の合成例はなく、有機合成化学的にチャレンジングな課題である。我々は、これまで報告例の無かった 4 位に桂皮酸エステルが結合する糖の合成法の開発に着手した。すなわち糖部分の保護基の最適化を行う目的で、単純なアグリコンを用いたグリコシル化のモデル実験の計画を立案した。さらに、アグリコン部位に官能基が少ない植物由来のトリテルペンである Oleanolic acid を用いるモデルサポニンの合成の検討を行うこととした。

また Onjisaponin 類のサポニンのアグリコンである Tenuifolin の単離精製法は報告されてはいるが、原料となる *Polygala senega* (生薬名; セネガ) からの供給は、合成研究の発原料とするには、良好とは言えない。そこで Tenuifolin の単離精製法についても検討した。

1) 合成計画

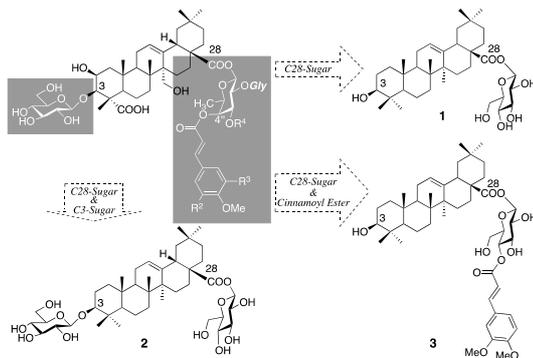
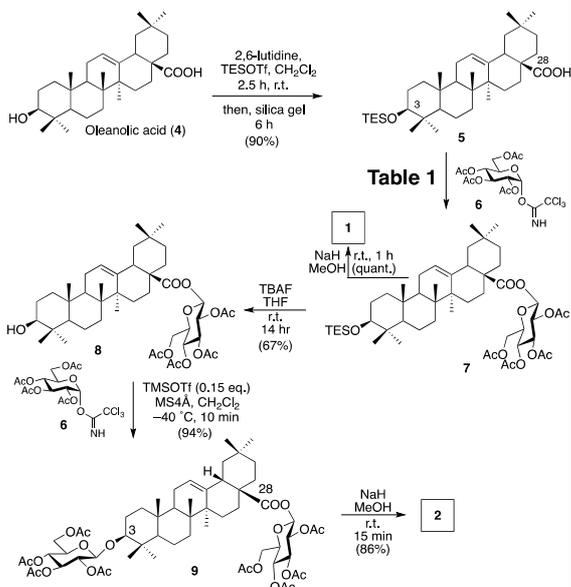


Figure 2. SAR Concept of modified saponins 1, 2, 3.

誘導体合成を含めた本研究計画の遂行には C28 位グリコシル化を良好に進行させる必要がある。C28 位の糖部分のエステル結合は、通常のグリコシド結合と比較して弱く、活性化剤の存在下切断の恐れがある。そこでアクセプターの反応性、並びにエステル結合を介したグリコシド結合の安定性を確認する目的で、アクセプターとして Oleanolic acid (4) を用いる実験を行うこととした。その際に C28 位の配糖化について検討して誘導体 1 を得る計画を立案した。さらに 3 位に配糖化を施し誘導体 2 の合成も同時に行うこととした。また C28 位グリコシル化の検討を活かして、桂皮酸エステルが結合するグリコシド 3 を合成す

ることした。(Figure 2)

2) マイクロフローリアクターを利用した C28 位配糖化の検討



Scheme 1. Synthesis of saponins 1 and 2.

サポニン 1 及び 2 の合成を scheme 1 にまとめた。Penta-*O*-acetyl-β-D-glucose を出発物質とし、2 工程を経て既知のグリコシルドナー 6 を得た。続いて、Oleanolic acid から簡便に調製できるアクセプター 5 をアグリコンとし、グリコシル化反応の検討を行った (Table 1)。

Table 1. The C28 glycosylation with microflow reactor.

| entry | Donor 6 X [M] | BF ₃ ·OEt ₂ Y [M] | Flow rate [mL/min] | yield [%] ^a |
|----------------|---------------|---|--------------------|------------------------|
| 1 | 0.98 | 0.098 | 0.5 | 0 |
| 2 | 0.98 | 0.098 | 0.7 | 0 |
| 3 | 0.98 | 0.98 | 0.6 | 51 |
| 4 | 1.96 | 0.49 | 0.6 | quant. |
| 5 ^b | 2.0 eq | 1.0 eq | — | 86 |

^a Isolated yield. ^b Flask apparatus was used.

反応時間と温度制御が容易なマイクロフローリアクターを用い配糖化を検討した。アクセプター・ドナーを当量ずつ用いた配糖化では、ドナーの分解によりアクセプターが残存し、4 を収率良く得られなかった (Entry 3)。続いてドナーを 2 当量に増量し反応を試みると、アクセプターが消失し定量的に反応が進行した (Entry 4)。本実験結果は通常のフラスコを用いて行った操作に比べ (Entry 5) 収率

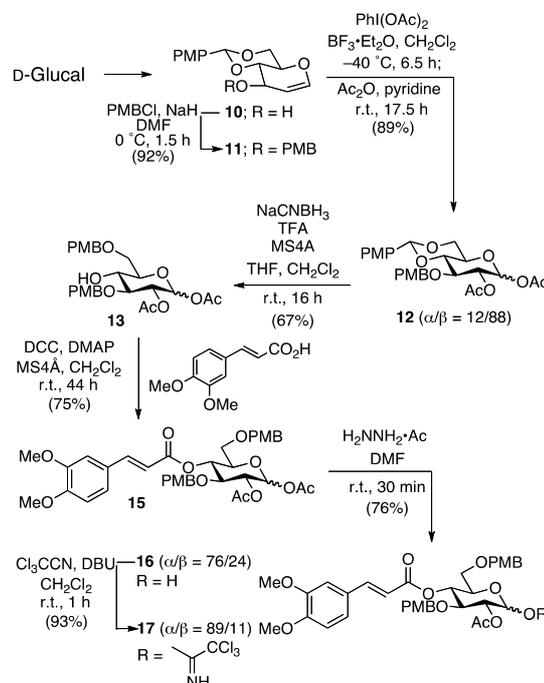
良くマイクロフローリアクターの有用性を証明できた。

得られた 7 を加水分解反応に付しサポニン 1 を得る事ができた。本実験の結果から、トリテルペンのエステル結合を介したグリコシド結合が、アルカリ加溶媒分解に安定であることが確認できた。

また 7 の 3 位の水酸基の TES 基を脱保護し 8 とした後、配糖化を行うことでグリコシド 9 へと導いた。続いて加溶媒分解を行い、サポニン 2 を合成することができた。加溶媒分解の後処理の際にポリスチレン系合成樹脂 DIAION[®] HP 20 を用いたカラムクロマトグラフィが収率向上に不可欠であった。

以上のようにしてマイクロフローリアクターを用いた C28 位のグリコシル化の定量的な進行によって迅速にサポニンを得る事に成功した。

3) 桂皮酸エステルが結合したサポニンの合成



Scheme 2 Synthesis of cinnamoyl glycosyl donor 17.

続いて桂皮酸エステルが結合するグリコシドの合成を行った (Scheme 2)。モデル実験の検討結果を参考に、tri-*O*-acetyl-D-glucose を出発物質とし、3 工程を経て 10 を合成した。10 の 3 位を PMB 基で保護し、11 とした。引き続き 4, 6-*O*-*p*-メトキシベンジリデンアセタールの位置選択的開裂反応を行った。TFA による酸性条件下 NaCNBH₃ を作用させたところ、中程度の収率で 4 位水酸基、6 位 PMB 基を有する 13 を得た。13 に対し、3, 4-dimethoxycinnamic acid との縮合反応により、4 位に桂皮酸エステルを導入し、15 とした後、さらに 15 に Hydrazine acetate を作用させ、1 位の Ac 基を脱保護し 16 を得た。16 を trichloroacetimidate

と変換して桂皮酸ドナー17を調整した。

続いて、アグリコンとして1の合成に用いたアクセプターと同様の5を用いて、グリコシル化反応を行い、β-グリコシド18を得た(Figure 3)。

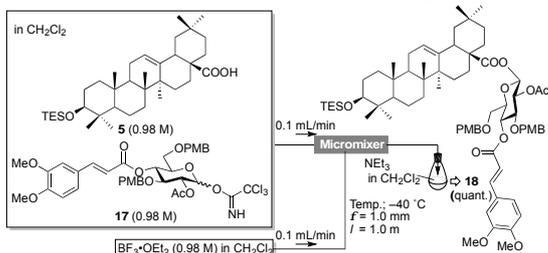
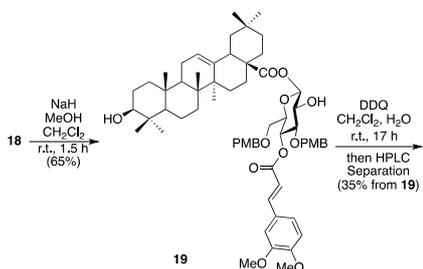


Figure 3 Glycosylation with cinnamoyl donor at by using microflow reactor.

さらに我々は、本グリコシル化反応に対してマイクロフローリアクターを使用したところ、ドナー:アクセプター比 1:1 の条件で定量的に本反応が進行することを見いだした。

Scheme 3 The deprotection toward cinnamoyl saponin 3.



その後、TES基、アセチル基の除去、続いてPMB基の脱保護を行うことで目的の桂皮酸含有サポニン3の合成に成功した(Scheme 3)。

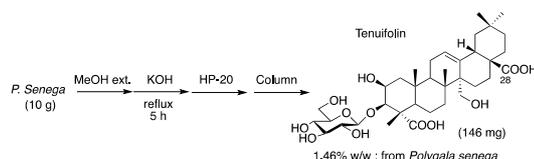
以上のようにして、C28位の配糖化の検討を目的として3種の誘導体を合成することができた。これらOleanolic acid由来の合成サポニンのアジュバント活性を測定する予定である。これにより、糖の重要性を含めた構造活性相関を明らかにできると期待している。

4) Tenuifolinの大量取得に向けた効率的単離法の開発

これまで述べた方法を用いて植物由来のアジュバントの合成を試みるにはOnjisaponinのサポニンのアグリコンであるTenuifolinの大量取得が不可欠である。Tenuifolinの単離精製法は報告されてはいるが、原料となる*Polygala senega*からの重量収率は0.29%と良好とは言い難い。⁷⁾ また、複数回繰り返される分液操作や、それに伴う大量の溶媒使用、器具の大きさによる限界、複雑な工程を経るために要する時間など、スケールアップ上の問題点が多い。そこで、今回筆者は分液操作を経ない、より効率的な単離法の確立を目指すこととした。

Polygala senega (10 g) 根茎部のMeOH抽出

エキスを濃縮し、得られた粗生成物に水酸化カリウム水溶液を用いて加水分解反応を行った。次に分液操作の代わりに合成吸着剤DIAION[®] HP-20を用い、H₂O-MeOHで分画した。通常、加水分解反応後に塩酸による中和処理を行うが、中和処理後のカリウム塩の析出がクロマト操作に支障をきたす。DIAION[®] HP 20による分画操作では、中和処理を省略することができた。続いて、得られたMeOH画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで単離精製し、最終的にTenuifolin (145.6 mg, 1.46% w/w)を得た、分液操作、中和処理を経ない方法が結果的に実験工程の短縮に繋がり、従来法による単離に比べ、収率を約5倍に増量し、使用する溶媒量を約75%削減できた(Scheme 5)。



Scheme 5 An improved preparation of tenuifolin from *P. senega* using a synthetic polystyrenic adsorbent.

これまで述べてきた様に、筆者は、1) マイクロフローリアクターを用いた配糖化の検討、2) 上記配糖化を利用したサポニン誘導体の合成、及び3)さらなる官能基化されたサポニン合成を可能にする天然物の単離を行うことができた。

今後は、これらの知見を活かしてサポニン誘導体を合成し、ワクチンアジュバントの創製に繋げていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

— Takata, Keiko; Iwatsuki, Masato; Yamamoto, Tsuyoshi; Shirahata, Tatsuya; Nonaka, Kenichi; Masuma, Rokuro; Hayakawa, Yoichi; Hanaki, Hideaki; Kobayashi, Yoshinori; Petersson, George A.; Ōmura, Satoshi; Shiomi, Kazuro: **Aogacillins A and B produced by *Simplicillium* sp. FKI-5985: new circumventors of arbekacin resistance in MRSA**: *Organic Letters* (2013), 15(18), 4678-4681. (査読有)

— Ideguchi, Tetsuya; Yamada, Takeshi; Shirahata, Tatsuya; Hirose, Tomoyasu; Sugawara, Akihiro; Kobayashi, Yoshinori; Ōmura, Satoshi; Sunazuka, Toshiaki: **Asymmetric Total Synthesis of Neoxaline**: *Journal of the American Chemical Society* (2013), 135(34), 12568-12571. (査読有)

— Murphy, Graham K.; Shirahata, Tatsuya;

Hama, Naoto; Bedermann, Aaron; Dong, Ping; McMahon, Taravis C.; Twenter, Barry. M.; Spiegel, David A.; McDonald, Ivar. M.; Taniguchi, Nobuaki; Inoue, Munenori; Wood, John. L.: **Toward the Synthesis of Phomoidride D: *Journal of Organic Chemistry* (2013), 78, 477-489. (査読有)**

[学会発表](計5件)

Tatsuya Shirahata, Hiroaki Kiyohara, Nozomu Hirata, Masaki Yokoyama, Tatsuya Katsumi, Takashi Nishino, Kazuishi Makino, Takayuki Nagai, Haruki Yamada, Eisuke Kaji, Yoshinori Kobayashi **Synthesis and Effect of Nasal Administration on Nasal Anti-Influenza Virus Antibody Titer against Second Nasal Inoculation of Influenza HA Vaccine of Oleanolic acid Saponins** International Conference on the Chemistry of Antibiotics and other bioactive compounds (ICCA-13, Yamanashi, Japan) Sep. 25th 2013.

Tatsuya Shirahata, Hiroaki Kiyohara, Nozomu Hirata, Masaki Yokoyama, Tatsuya Katsumi, Takashi Nishino, Kazuishi Makino, Takayuki Nagai, Haruki Yamada, Eisuke Kaji, Yoshinori Kobayashi **Synthesis and Effect of Nasal Administration on Nasal Anti-Influenza Virus Antibody Titer against Second Nasal Inoculation of Influenza HA Vaccine of Oleanolic acid Saponins** Gordon Research Conferences Heterocyclic Comounds (Newport, RI, USA), Jun. 17th 2013.

白畑辰弥, 小島麻実, 照屋智子, 鰻池将吾, 横山将来, 松尾淳一, 牧野一石, 砂塚敏明, 梶英輔, 大村智, 小林義典 1-OH糖を使用した脱水的グリコシル化による三糖合成、日本薬学会第133年会(横浜) 2013年3月28日、横浜・パシフィコ横浜

白畑辰弥, 勝見達也, 横山将来, 平田望, 永井隆之, 清原寛章, 山田陽城, 梶英輔, 小林義典 マイクロフローリアクターを利用した桂皮酸エステルを有するサポニンの合成研究、第64回有機合成化学協会関東支部シンポジウム(新潟・長岡) 2012年12月1日、新潟・長岡科学技術大学

白畑辰弥, 勝見達也, 横山将来, 平田望, 永井隆之, 清原寛章, 山田陽城, 梶英輔, 小林義典 マイクロフローリアクターを利用した桂皮酸エステルを有するサポニンの合成研究、Glyco Tokyo 2012(東京) 2012年11月17日、東京・慶應大学薬学部

[その他]

ホームページ

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/shoyaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白畑 辰弥 (TATSUYA SHIRAHATA)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号: 30414056